

卵黄低密度リポタンパク質とレシチンとの複合体の調製とその乳化性

水 谷 令 子

Preparation and Emulsifying Properties of a Complex between Apoprotein from Hen's Egg Yolk Low Density Lipoprotein and Egg Yolk Lecithin.

Reiko MIZUTANI

1. 緒 言

卵黄は良質の乳化剤でありマヨネーズをはじめとして調理や食品加工の素材として広く利用されている。卵黄の示す高い乳化性は、かつてはレシチンがその根源物質であるとされていた。しかし、現在では卵黄の乳化はリポタンパク質に依るとされる知見が多い。

卵黄固形物の大半はリポタンパク質として存在し、タンパク質と脂質が種々の割合で結合した巨大な複合体を形成している。そのうち主成分である低密度リポタンパク質 (LDL) は約90%の脂質を含み、中性脂質を中心核として、表面にリン脂質とタンパク質を配した分子量数百万といわれる巨大分子である。筆者はこれまでに LDL の乳化性に関する実験を行ってきた。

それによると、乳化性が優れているタンパク質と言われている牛血清アルブミン (BSA) に比べて、LDL は乳化活性、乳化安定性共に高い値を示した¹⁾

Protease を用いて LDL の表面付近に存在していると考えられるアポタンパク質を分解していくと、その分解程度に従って乳化活性は低下した。また、Protease を用いて表面付近にほとんどタンパク質が存在しないと考えられる程度まで分解した時でも乳化活性、乳化安定性共にかなり高い値を示した²⁾

これらの結果は LDL の乳化性にタンパク質部分が大きく寄与していると共に LDL のもつタンパク質・脂質複合体という特殊な構造が乳化性発現にとって重要であることを示唆している。

本研究は、人工的に LDL 様構造体を調製してタンパク質・脂質複合体の乳化性への寄与について検討した。

タンパク質・脂質複合体は LDL から脱脂によって得られたアポ LDL と卵黄レシチンを用いて調製した。また、複合体の乳化におけるタンパク質部分の違いに関する検討も併せて行った。

すなわち、アポ LDL をゲル濾過法に依って低分子画分と高分子画分に分け、それらを用いて調製した複合体の乳化性の測定を行った。

2. 実験材料及び実験方法

LDL とアポ LDL の調製

LDL は白色レグホン系のニワトリの新鮮卵より Raju ら¹⁾³⁾の方法に準じて調製した。希食塩水に溶解している LDL を蒸留水を用いて充分 (48時間) 透析した後凍結乾燥した。乾燥 LDL (6 g) にクロロホルム-メタノール (2 : 1, V/V) 混合液を250ml加えて、ときどき攪拌しながら3時間放置した。プフナーロートを用いて濾過し、沈澱物はさらにクロロホルム-メタノール混合液100mlを加えて同様に処理した。この得られた沈澱を集めて減圧下で乾燥した後、乳鉢を用いて粉末とした。さらにもう1度クロロホルム-メタノール混合液100mlで脱脂した。得られたアポ LDL は、薄層クロマトグラフィーによって完全に脂質が除去されていることを確認した。6 gの乾燥 LDL より約0.6gのアポ LDL を得ることが出来た。

レシチンの調製

卵黄レシチンは、白色レグホン系ニワトリの新鮮卵より Singleton ら⁴⁾の方法に準じてアセトン沈澱法を用いて調製した。

アポ LDL の分画

アポ LDL を0.2M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) 中に分散した後 Insonator (Model 200-M, クボタ, 東京) を用いて超音波処理することによって溶解した。遠心分離した上清を Sephadex G-100カラム (1.9×65cm) を用いてゲル濾過した。溶出には0.02M クエン酸緩衝液 (pH3.0) を用いた。同じカラムを用いてゲル濾過を繰り返し、低分子画分; B, 高分子画分; Aを得た。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

アポ LDL のそれぞれの画分は、SDS を含む12.5%アクリルアミドゲルを用いて Laemmli⁵⁾の方法に準じて電気泳動を行った。ゲルは0.25% CBBR-250/プロパノール/酢酸溶液で染色し、7%酢酸-10%メタノール溶液を用いて脱色した。

乳化活性の測定

乳化活性の測定は Pearce と Kinsella の濁度法に準じて行った⁶⁾

落花生油と乳化剤溶液を 1 : 1 に混合した。Polytoron (Kinematica, Switzerland; Model CH-6010) を用いて45秒間攪拌してエマルジョンを調製した。直ちに0.1%トリトン X-100溶液で500倍に希釈し、分光光度計を用いて500nm での吸光度を測定した。本研究においては、

吸光度をそのまま乳化活性値として用いた。

アポ LDL-卵黄レシチン複合体の調製

正確にタンパク質濃度を測定したアポ LDL 溶液とそのタンパク質量の10倍量のレシチンを超音波処理機のカップに入れた。流水（約20℃）で冷却しながら最大出力（200W）で10分間超音波処理を行った。乳化活性の測定のためのエマルジョン調製は超音波処理後直ちに行った。

タンパク質の定量

タンパク質濃度の測定は牛血清アルブミン (BSA) 溶液を標準として、SDS を含む試薬を使った Lowry 法の改良法⁷⁾を用いて行った。アポタンパク質やレシチンを含む溶液は多くの場合濁っているためである。

BSA は Sigma 社製市販品 (Fraction V) をそのまま使用した。

CD スペクトル測定

クエン酸緩衝液 (pH3.0) に溶解したアポ LDL (0.2mg/ml) およびアポ LDL-レシチン複合体 (アポ LDL を0.1mg/mlを含む複合体溶液) を用いて CD スペクトルの測定を行った。測定には Spectropolarimeter J-40 (日本分光, 東京) を用いて行い、セルは 1 mm のものを使用した。

3. 結果及び検討

アポ LDL の溶解と分画

LDL は希食塩水に溶解している場合には非常に安定で、1年以上保存した後もその乳化活性値に変化がみられない。しかし、LDL を凍結乾燥した後は水溶液に分散しても Native と同じ状態には戻らない。さらに、LDL から脱脂によってタンパク質のみを分離すればタンパク質は著しく変性する。なるべく変性の少ない状態のアポタンパク質を調製する方法を検討したが本実験に適したよいものは得られなかった。やむおえず方法の項で示したように凍結乾燥した LDL からクロロホルム-メタノール (2 : 1) を用いて完全に脂質を除去したアポ LDL に依って以下の実験を行った。

アポ LDL は pH3.0以下の緩衝液に分散した後超音波処理すると約50%ペプチドが溶解した。Fig. 3 の SDS-PAGE のパターンをみると pH3.0において溶解したペプチド (line 4) は幾らか会合したと考えられるバンドが見られるものの Native LDL (line 1) と同じように高分子から低分子までのペプチドを含んでいた。

Sephadex G-100カラムを用いてゲル濾過をすると A, B 2つのピークに分かれた (Fig. 1)。A, B それぞれの画分を同じカラムを用いて数回ゲル濾過を繰り返した。最終的に得たアポ LDL-A およびアポ LDL-B のゲルカラムからの溶出パターンを Fig. 2 に示した。

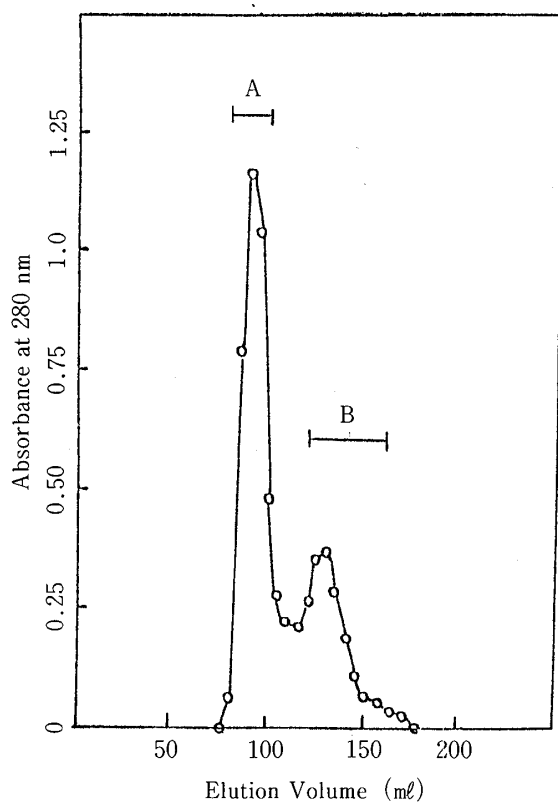


Fig. 1 Gel filtration of apoLDL at pH 3.0.
Column; Sephadex G-100 (1.9×65cm)
Elution; 0.02M citrate buffer (pH 3.0)

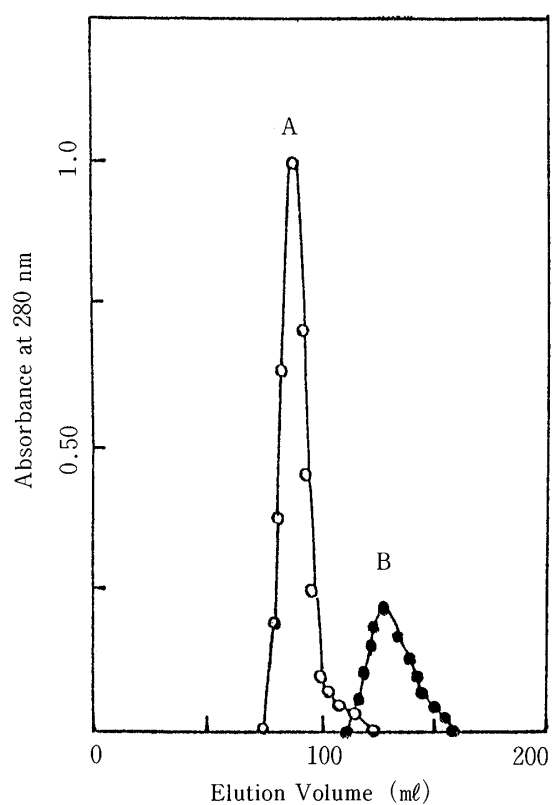


Fig. 2 Gel filtration of apoLDL-A and apoLDL-B.
Column; Sephadex G-100 (1.9×65cm)
Elution; 0.02M citrate buffer (pH 3.0)



Fig. 3 SDS-PAGE of apoLDL.
line 1; native LDL, 2;apoLDL-B, 3; apoLl
4; pH 3.0 soluble apoLDL; 5; pH 3.0 ins
apoLDL.
20μg of each protein was applied on the gel.

また、それらの SDS-PAGE のパターンは Fig. 3 に示した。アポ LDL-A はアポビテレン I⁸⁾に相当すると考えられる低分子のバンドもわずかに見られるがほとんどは分子量 5 万以上の高分子ペプチドより成っている。アポ LDL-B はアポ LDL-A より低分子ペプチド含量の多い区分でアポビテレン I に相当するペプチドが主成分であるが、これらの会合体もわずかに混在していた。

アポ LDL 複合体の乳化性

pH3.0 のクエン酸緩衝液によって溶解したアポ LDL にさまざまな量のレシチンを加えて超音波処理した。処理前には混濁していた試料液は超音波処理することによって透明な溶液とすることが出来た。この方法で得られた溶液を Sephacryl S-400 カラムを用いてゲル濾過するとレシチンとタンパク質は同一画分に単一のピークとして回収された⁹⁾。従ってアポ LDL とレシチンは 1 つのまとまった構造体として存在しているものと考え、これをアポ LDL-レシチン複合体とした。

アポ LDL 複合体の乳化性を測定した結果を Fig. 4 に示した。アポ LDL の乳化活性は約 0.48 であった。レシチンと複合体を形成したときはその乳化活性は著しく上昇した。そしてレシチン量が多くなるにしたがって乳化活性も増大した。比較のために BSA をレシチンと共に超音波処理した溶液についても乳化活性を測定した。BSA のみではアポ LDL とほとんど同じで

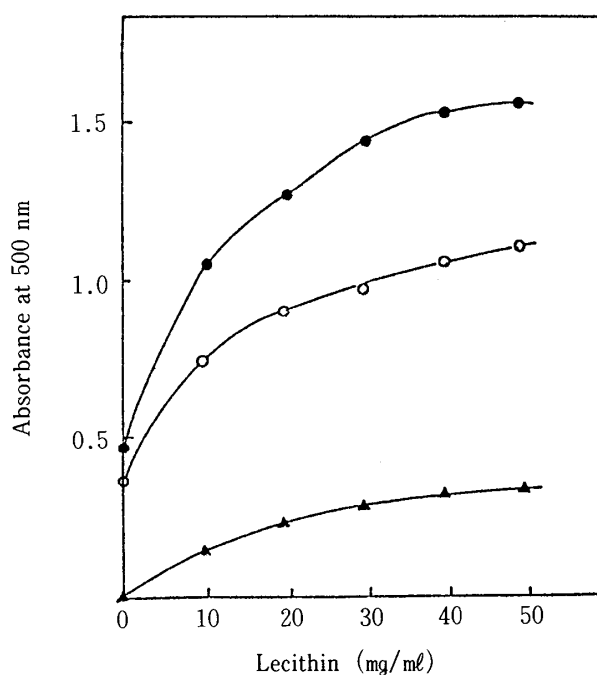


Fig. 4 Emulsifying activity of apoLDL complex(—●—), BSA complex(—○—) and lecithin(—▲—). Both emulsions of apoLDL and BSA complex were prepared at pH 3.0. The concentration of apoLDL or BSA and lecithin in the complex solution were adjusted to 5.0 mg/ml.

あったがレシチンとの複合体を調製した場合には両者の差は広がった。レシチン単独で測定した乳化活性は著しく小さかった。複合体の乳化活性は BSA あるいは LDL とレシチンの乳化活性の和よりさらに大きくなった。ここで BSA も LDL と同様複合体を形成していることが確認されている¹⁰⁾

アポ LDL-A および B, それらとレシチンとの複合体の乳化活性を Fig. 5 に示した。アポ LDL-B の乳化活性は小さく, アポ LDL-A とは異なっていた。しかし, それぞれのペプチドを用いて調製した複合体の乳化活性にはほとんど差はなかった。すなわち, アポ LDL の低分子画分(B)はアポ LDL の複合体形成による乳化活性の上昇に寄与していると考えられた。

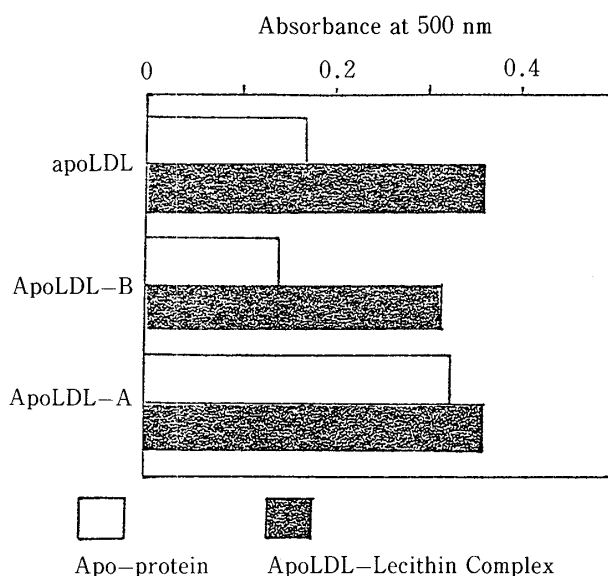


Fig. 5 Emulsifying activity of apoLDL and apoLDL-lecithin complex.

The concentration of protein and lecithin in the solution were adjusted to 0.5 mg/ml and 5mg/ml, respectively.

アポ LDL 及びその複合体の CD スペクトル

CD スペクトルの測定結果は Fig. 6 に示した。ここで興味あることは LDL は脱塩, 凍結乾燥, クロロホルム-メタノールによる脱脂, さらに緩衝液中で超音波処理をした後も規則構造がかなり残っていたことである。アポ LDL とレシチンを超音波処理によって調製した複合体の CD スペクトルはアポ LDL とほとんど同じであった。Walsh ら¹¹⁾ は血清リポタンパク質のアポ B がリン脂質と相互作用した場合に α -ヘリックス量が増すと述べているが本実験では複合体形成によってタンパク質の二次構造に変化はみられなかった。

本実験によってアポ LDL はレシチンと複合体を形成することに依って乳化活性が著しく上昇することが示された。そして, アポ LDL の低分子ペプチド画分が複合体の乳化性上昇に寄与していると考えられた。

以上により LDL の乳化性が著しく高いのは LDL のタンパク質・脂質複合体という特殊な構

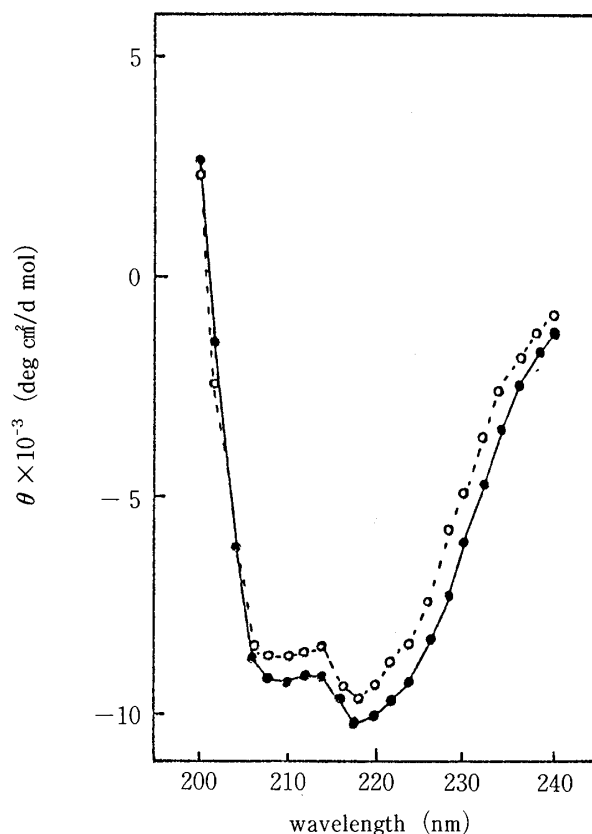


Fig. 6 Circular dichroic spectra of apoLDL and apoLDL-lecithin complex.
apoLDL(---○---), apoLDL-lecithin complex(—●—).

造に起因していることが明かとなった。

本研究は名古屋大学農学部食品工業化学科食品化学第二講座において中村良教授の指導のもとに行ったものである。

参考文献

- 1) Mizutani, R. and Nakamura, R., *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **17**, 213 (1984)
- 2) Mizutani, R. and Nakamura, R., *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **18**, 60 (1985)
- 3) Raju, K. S. and Mahadevan, S., *Anal. Biochem.*, **61**, 538 (1974)
- 4) Singleton, W. S., *Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 53 (1965)
- 5) Laemmli, U. K., *Nature (London)*, **222**, 680 (1970)
- 6) Pearce, K. N. and Kinsella, J. E., *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716 (1978)
- 7) Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Biebel, I. L. and Tolbert, E., *Anal. Biochem.*, **87**, 206 (1978)
- 8) Burley, R. W. and Sleight, R. W., *Aust. J. Biol. Sci.*, **33**, 255 (1980)
- 9) Mizutani, R. and Nakamura, R., *Agric., Biol. Chem.*, **51**, 1115 (1987)
- 10) Nakamura, R., Mizutani, R., Hayakawa, S. and Yano, M., *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 729 (1988)
- 11) Walsh, M. T. and Atkinson, D., *Biochemistry*, **22**, 3170 (1983)